RNAi 介导的棉铃虫氨肽酶 N 基因 *Haapn1* 和钙粘蛋白基因 *Ha_BtR* 沉默对 Cry1Ac 毒力的影响

周慧丹，杨亦桦，吴益东*

（南京农业大学植物保护学院，农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室，南京 210095）

摘要：氨肽酶 N(aminopeptidase N, APN)和钙粘蛋白(cadherin)是存在于鳞翅目昆虫中肠刷状缘膜囊(brush border membrane vesicles, BBMV)上 Bt 毒素 Cry1A 的受体。本实验将棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 氨肽酶 N1 基因 *Haapn1* 和钙粘蛋白基因 *Ha_BtR* 双链 RNA(dsRNA)注入棉铃虫 4 龄幼虫体内，以研究这两种受体基因沉默后对 Cry1Ac 毒力的影响。结果表明：注射 dsRNA(1 μg/头)进行基因沉默后，*Haapn1* mRNA 表达量比注射缓冲液(elution solution, ES)的对照下降了 30% ~49%，*Ha_BtR* mRNA 表达量下降了 30% ~37%。注射 *Haapn1* dsRNA 的幼虫在 40 和 70 $\mu g/cm^2$ Cry1Ac 活化毒素下的死亡率显著低于注射 ES 的幼虫，而在 100 和 170 $\mu g/cm^2$ Cry1Ac 原毒素处理下两者死亡率无显著差异；Cry1Ac 活化毒素以及原毒素对注射 *Ha_BtR* dsRNA 幼虫与注射 ES 幼虫的毒力均无显著差异。当同时注射 *Haapn1* 及 *Ha_BtR* dsRNA 后，干扰后的幼虫对 Cry1Ac 活化毒素和原毒素的敏感性均显著下降。本研究进一步证明了棉铃虫 Haapn1 和 Ha_BtR 均是 Bt 毒素 Cry1Ac 的功能受体，这两种受体蛋白共同参与 Cry1Ac 的毒杀作用过程。该结果也提示，*Haapn1* 或 *Ha_BtR* 基因产生突变都可能导致棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性。

关键词：棉铃虫；Bt 毒素受体；原毒素；RNA 干扰；基因沉默；氨肽酶 N；钙粘蛋白

中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)10-1097-07

Effects of RNAi-mediated silencing of an aminopeptidase N gene *Haapn1* and a cadherin gene *Ha_BtR* on Cry1Ac toxicity against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHOU Hui-Dan, YANG Yi-Hua, WU Yi-Dong* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects of the Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Aminopeptidase N (APN) and cadherin are key receptors of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in brush border membrane vesicles (BBMVs) of lepidopteran insects. Effects of RNAi-mediated silencing of an APN gene *Haapn1* and a cadherin gene *Ha_BtR* on Cry1Ac toxicity were investigated by injecting dsRNAs of these two genes into the 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* in this experiment. Reduction of mRNA expression of *Haapn1* (30% - 49%) and *Ha_BtR* (30% - 37%) was observed in the larvae injected respectively with *Haapn1* dsRNA and *Ha_BtR* dsRNA (1 μg/larva) compared with the control larvae injected with elution solution (ES) only. Mortality of larvae injected with *Haapn1* dsRNA was significantly lower than that of the control larvae injected with ES in treatments of 40 and 70 $\mu g/cm^2$ of activated Cry1Ac, but there was no difference in mortality of larvae injected with either *Haapn1* dsRNA or ES in treatments of 100 and 170 $\mu g/cm^2$ of Cry1Ac protoxin. RNAi-mediated gene silencing by injecting *Ha_BtR* dsRNA had no effect on toxicity of both activated Cry1Ac and Cry1Ac protoxin. However, toxicity of both activated Cry1Ac and Cry1Ac protoxin against the 4th instar larvae injected with a mixture of *Haapn1* dsRNA and *Ha_BtR* dsRNA was significantly reduced. These results further confirm that both Haapn1 and Ha_BtR are functional receptors of Cry1Ac in *H. armigera*, and both of them are involved in intoxication of Cry1Ac. Our results also suggest that mutations occurring in either *Haapn1* or *Ha_BtR* may result in resistance to Cry1Ac in *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; Bt toxin receptor; protoxin; RNAi; gene silencing; aminopeptidase N; cadherin

---

基金项目：国家自然科学基金项目(30870343)

作者简介：周慧丹，女，1985 年生，硕士研究生，研究方向为昆虫分子毒理学，E-mail：zhouhuidan@gmail.com

*通讯作者 Corresponding author, E-mail：wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2010-04-08；接受日期 Accepted：2010-06-20

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 是一种革兰氏阳性细菌，在其产生孢子的过程中有伴孢晶体的形成，这些晶体对一些昆虫有杀虫作用，称之为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins，ICPs)，即 Bt 毒素。当昆虫取食杀虫晶体后，原毒素在昆虫中肠碱性条件下经蛋白酶水解为约 60 kDa 的活化毒素，进而和昆虫中肠刷状缘膜囊(brush border membrane vesicles，BBMV)上的受体互作，并在中肠细胞膜上形成穿孔，引起离子渗漏，导致细胞膨胀解体，最后死亡(Bravo *et al*.，2007)。

氨肽酶 N(APN)和钙粘蛋白(cadherin)是 Bt 毒素 Cry1A 的受体蛋白(Bravo *et al*.，2007)。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 等多种鳞翅目昆虫中证实 APN 是 Bt 毒素的功能受体(Knight *et al*.，1994；Vadlamudi *et al*.，1995)。APN 表达量下降或基因缺失突变可以导致昆虫对 Bt 产生抗性(Rajagopal *et al*.，2002；Herrero *et al*.，2005；Zhang *et al*.，2009)。同样，也在多种鳞翅目昆虫中证实钙粘蛋白是 Bt 毒素的功能受体。已在 3 种棉花害虫：烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中发现钙粘蛋白基因突变可以导致对 Bt 毒素 Cry1Ac 产生高水平抗性(Gahan *et al*.，2001；Morin *et al*.，2003；Xu *et al*.，2005)。

棉铃虫 *H. armigera* 是世界性的农业害虫，其对化学杀虫剂产生抗性的问题曾严重制约了我国的棉花生产。自 1996 年 Bt 棉花商业化种植以来，我国棉铃虫得到了有效控制(Wu *et al*.，2008)。Bt 棉花在整个生长期内都表达 Bt 毒素(Cry1Ac)，使棉铃虫处于持续的选择压力下，并且经室内筛选已得到对 Cry1Ac 具有高水平抗性的多个棉铃虫品系(Akhurst *et al*.，2003；Xu *et al*.，2005；Rajagopal *et al*.，2009)，表明棉铃虫对 Bt 棉花具有潜在的抗性风险。

棉铃虫 Cry1Ac 抗性品系 GYBT 的钙粘蛋白基因 *Ha_BtR* 由于缺失突变导致终止密码子提前(*r1*)，产生截短的钙粘蛋白使 Bt 毒素丧失结合部位，从而对 Cry1Ac 产生抗性(Xu *et al*.，2005；Yang *et al*.，2006)。Yang 等(2007)通过 F_1 筛查法，成功地从河南安阳田间种群中捕获可导致 Cry1Ac 抗性的钙粘蛋白基因的 2 个新突变型(*r2*，*r3*)，这 2 个新突变均由逆转录转座子插入而产生。Zhao 等(2010)从江苏江浦棉铃虫田间种群中分离到 5 种与 Cry1Ac 抗性相关的钙粘蛋白突变型(*r4* – *r8*)。上述研究表明棉铃虫幼虫中肠钙粘蛋白是 Bt 毒素 Cry1Ac 重要靶标受体之一，*Ha_BtR* 的功能丧失性突变能够导致对 Cry1Ac 的高水平抗性。在棉铃虫对 Cry1Ac 的其他抗性品系中，存在不同的抗性机理。棉铃虫氨肽酶 N 基因 *Haapn1* 表达下调或突变也可以使棉铃虫产生抗性(Sivakumar *et al*.，2007；Zhang *et al*.，2009)，但是在田间种群中还未发现类似的基因突变。Rajagopal 等(2009)发现棉铃虫抗性品系的一种蛋白酶基因 *HaSP2* 表达丧失，使原毒素不能正常活化，从而对原毒素产生抗性，而该抗性品系对活化毒素没有抗性。

RNA 干扰(RNA interference，RNAi)是由双链 RNA 引起的转录后沉默机制(Fire *et al*.，1998；Zamore *et al*.，2000)，由于其具有特异性，能够高效率地抑制基因表达，RNAi 已成为研究基因功能的重要工具。目前已在烟草天蛾(Soberón *et al*.，2007)、棉铃虫(Sivakumar *et al*.，2007；Kumar *et al*.，2009)、斜纹夜蛾 *Spodoptera litutra*(Rajagopal *et al*.，2002)等鳞翅目昆虫中应用 RNAi 研究 Bt 受体基因的功能。本研究通过注射 dsRNA 的方法干扰棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因的表达，测定单个基因被沉默或两个基因同时被沉默后对 Cry1Ac 活化毒素和原毒素毒力的影响，以期探明棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 这两个受体在 Bt 毒素 Cry1Ac 毒杀过程中的相互作用，有助于对 Bt 毒素作用机理和抗性机理进行更全面的认识。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

敏感棉铃虫种群(SCD)已在室内饲养多年，饲养期间未接触任何杀虫剂。棉铃虫幼虫采用以麦胚粉和大豆粉为主要成分的人工饲料饲养，温度 27 ± 1℃，光照周期 16L∶8D，成虫饲以 10% 糖水以补充营养(Yang *et al*.，2009)。

1.2 主要试剂

Cry1Ac 原毒素由苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种 HD-73 菌株制备，用胰蛋白酶对原毒素进行活化制备活化毒素。SV Total RNA Isolation System 和 RT-PCR 第一链合成试剂盒购自 Promega 公司；MEGAscript RNAi Kit 购自 Ambion 公司；SYBR Green Realtime PCR Premix 购自 TaKaRa 公司。

1.3 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因片段的克隆以及 dsRNA 合成

采用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒(Promega 公司)提取单头 5 龄幼虫中肠总 RNA，在 PCR 管中加入 2 μg 总 RNA、2 μL oligo(dT)$_{15}$引物

和 M-MLV 逆转录酶(Promega 公司)合成 cDNA 第一链。根据已有的棉铃虫 *Haapn1*(GenBank 登录号为 AF521659)和 *Ha_BtR*(GenBank 登录号为 AY647974)全长 cDNA 序列设计特异性引物(表 1)。将扩增的 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 片段(经克隆、测序验证)作为模板，采用 MEGAscript RNAi Kit 分别转录得到正义 RNA 和反义 RNA，将互补的正义 RNA 和反义 RNA 混合，75℃孵育 5min，冷却至室温，在冷却过程中退火形成 dsRNA，用 DNase Ⅰ 和 RNase 消化模板中的 DNA 以及 ssRNA，最后纯化得到 dsRNA，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA 质量后，－70℃保存备用。

表 1　合成 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* dsRNA 所用的引物

Table 1　Primers used for *Haapn1* and *Ha_BtR* dsRNA production

基因 Gene	引物 Primer	序列(5′－3′) Sequence	产物长度 (bp) Product length
Haapn1	apn1FT7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTAGCTCGAGCTGGCATT	585
	apn1R	TGTGGTCTTGAGGCCGAGTCAT	
	apn1F	GTTAGCTCGAGCTGGCATT	585
	apn1RT7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGA TGTGGTCTTGAGGCCGAGTCAT	
Ha_BtR	BtRFT7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCATCACTTACACTCTG	558
	BtRR	CGTCTCGCCCCGTGAACAGG	
	BtRF	CCCATCACTTACACTCTG	558
	BtRRT7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACGTCTCGCCCCGTGAACAGG	

下划线部分为 T7 启动子序列。T7 promoter sequences were underlined.

1.4　dsRNA 注射剂量的确定

选择同一批棉铃虫 4 龄幼虫(体重为 100 ± 20 mg)，用 50 μL 微量进样器从幼虫背面将 dsRNA 或稀释缓冲液(elution solution，ES)注入幼虫体内。分别将 1，3，6 和 12 μg 目标基因 dsRNA(体积均为 6 μL)注射 4 龄幼虫各 10 头，对照注射同体积 ES (10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.0，1 mmol/L EDTA)，48 h 后制备中肠总 RNA(每个剂量取 5 头)，用于检测 RNA 干扰效率，以确定最佳注射剂量。

1.5　RNAi 基因沉默效率检测

注射 dsRNA 以及 ES 48 h 后提取单头 4 龄幼虫的中肠总RNA，反转录合成单链cDNA，用于定量 PCR。分别为 *Haapn1*、*Ha_BtR* 和一个持家基因——延伸因子 1α(*EF-1α*)设计了一对特异性引物(表 2)。20 μL 反应体系包含：10 μL SYBR Premix Ex Taq (2×)，上游引物、下游引物以及 ROX Reference (50×)各 0.4 μL，DNA 模板 2 μL 和 ddH_2O 6.8 μL。用 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems)完成定量 PCR。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法 (Livak and Schmittgen，2001)计算 mRNA 相对表达量。

1.6　生物测定

采用毒素涂表法进行生物测定(Xu *et al.*，2005)。将 Cry1Ac 毒素用磷酸缓冲液(PBS 0.01 mol/L，pH 7.4)稀释成一定的浓度，PBS 作为

表 2　定量 PCR 所用引物以及目标基因 GenBank 登录号

Table 2　Primers used for realtime PCR and the GenBank accession numbers of the target genes

基因 Gene	引物 Primer	序列(5′－3′) Sequence	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Haapn1	apn1F	GTTAGCTCGAGCTGGCATT	AF521659
	apn1R	CCGATGTCACAAAGGAAAGTCA	
Cadherin	C1F	AATCTGCTGACTGTAGTAGGACAC	AY647974
	C1R	GGCAGTTTCTCTCCTTGAATCAG	
EF-1α	EF-F	GACAAACGTACCATCGAGAAG	U20129
	EF-R1	GATACCAGCCTCGAACTCAC	

对照。在 24 孔板的每个孔(直径 1.6 cm)中注入 800 μL 棉铃虫饲料，注入时保持饲料表面平整，待饲料凝固后，在其表面加入 100 μL 不同浓度毒素溶液，常温晾干。在 24 孔板每孔内接入 1 头经注射处理的 4 龄幼虫(每个剂量 60 头幼虫)，盖上黑布以及盖子，置于温度 26 ± 1℃，相对湿度 60%，光周期 16L∶8D 的环境下饲养，5 d 后记录实验结果。

测定 Cry1Ac 原毒素和活化毒素的毒力回归线时，将饥饿了 48 h 的 4 龄幼虫(100 ± 20 mg)接入涂有毒素的 24 孔板内，Cry1Ac 活化毒素的剂量范围从 20 ~ 140 μg/cm^2，Cry1Ac 原毒素的剂量范围从 60 ~460 μg/cm^2，每个剂量测定 48 头幼虫，喂食毒素 5 d 后记录生测结果，用死亡机率值法计算毒力回归线。

1.7 数据分析与统计

采用 POLO-PC 软件计算 Cry1Ac 活化毒素以及原毒素 LC_{50}(LeOra Software, 1987)。死亡率差异的显著性用 DPS 数据处理系统 3.1.0.1 进行处理(唐启义和冯明光, 2007)，采用 Student's *t* 检验方法进行分析。

2 结果与分析

2.1 dsRNA 注射剂量的确定

在棉铃虫 4 龄幼虫体内注射 6 μL 不同剂量的 dsRNA(1, 3, 6 和 12 μg)，注射 ES 作为对照。48 h 后提取其中肠总 RNA，并检测 mRNA 表达量。注射 1 μg *Haapn1* dsRNA 后，*Haapn1* 基因表达量降为 49%，效果最佳；注射 6 μg 和 12 μg 后，*Haapn1* 表达量降至 50% ~60% 之间(图 1:A)。注射不同剂量的 *Ha_BtR* dsRNA 后，*Ha_BtR* mRNA 表达量均降为 70% 左右(图 1:B)。因此，均选用 1 μg dsRNA 作为 2 个基因的注射剂量进行后续 RNAi 研究。

2.2 Cry1Ac 活化毒素和原毒素对棉铃虫 4 龄幼虫

毒力测定结果表明，Cry1Ac 活化毒素对棉铃虫 4 龄幼虫的 LC_{50} 为 30.4 μg/cm^2(95% 置信限: 23 ~ 42 μg/cm^2)，Cry1Ac 原毒素的 LC_{50} 为 75.6 μg/cm^2 (95% 置信限: 63.4 ~ 88.2 μg/cm^2)。由于进行 dsRNA 注射处理的虫量有限，不能进行毒力回归线的测定。因此，分别选取两个剂量的 Cry1Ac 活化毒素(40 和 70 μg/cm^2)和 Cry1Ac 原毒素(100 和 170 μg/cm^2)进行 RNAi 后的毒力测定。

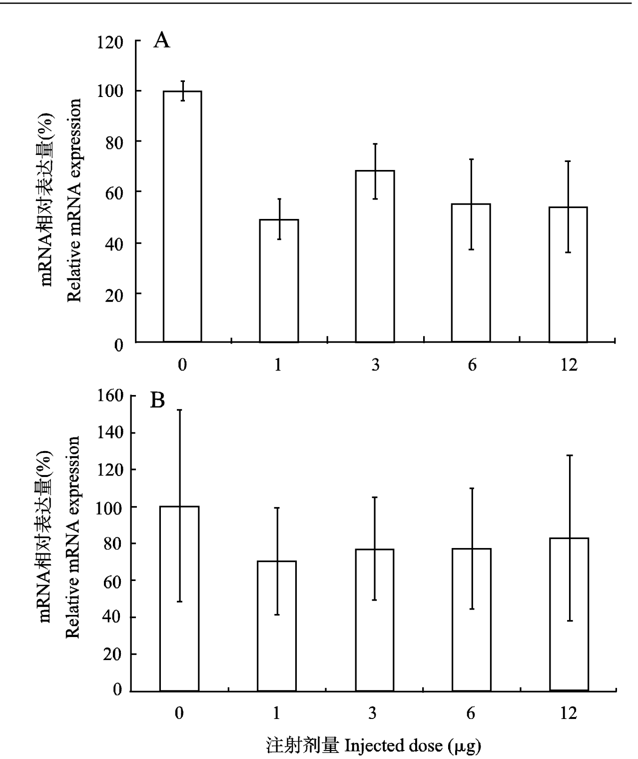


图 1 分别注射不同剂量 *Haapn1* (A) 和 *Ha_BtR* (B) dsRNA 对棉铃虫 4 龄幼虫的基因沉默效果

Fig. 1 Gene silencing efficacy on the 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* injected with a serial doses of either *Haapn1* (A) and *Ha_BtR* (B) dsRNAs

2.3 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因沉默对 Cry1Ac 毒力的影响

注射 *Haapn1* dsRNA 48 h 后，*Haapn1* 的 mRNA 表达量下降了 30%。Cry1Ac 活化毒素对注射 *Haapn1* dsRNA 幼虫的毒力显著低于注射 ES 的幼虫(图 2:A)，而 Cry1Ac 原毒素对两种处理的幼虫的毒力没有显著差异(图 2:B)。

注射 *Ha_BtR* dsRNA 后，*Ha_BtR* 的 mRNA 表达量也下降了 30%。Cry1Ac 活化毒素和原毒素对注射 *Ha_BtR* dsRNA 幼虫和注射 ES 幼虫的毒力没有显著差异(除原毒素 100 μg/cm^2 第 4 天的结果)(图 3:A,B)。

当注射 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 混合物(各 1 μg)后，Cry1Ac 原毒素和活化毒素对注射 dsRNA 幼虫的死亡率显著低于注射 ES 对照幼虫的死亡率，尤其在第 5 天，基因沉默处理组与对照组之间死亡率的差异达到极显著(图 4:A, B)。定量 PCR 检测表明 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因表达同时被沉默，与对照相比其表达量分别下降了 46% 和 37% (图 5)。

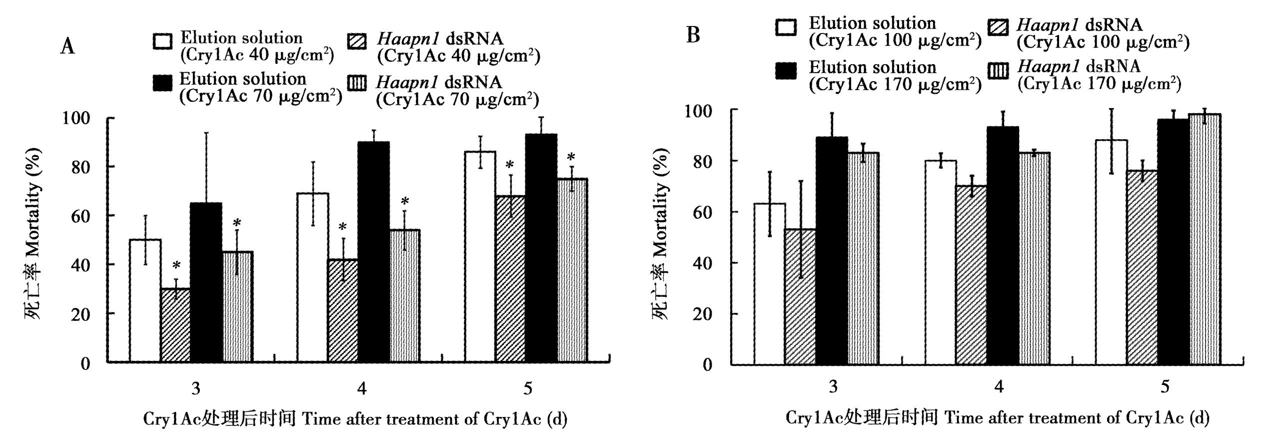


图 2　棉铃虫 *Haapn1* 沉默对 Cry1Ac 活化毒素(A)和 Cry1Ac 原毒素(B)毒力的影响

Fig. 2　Effects of *Haapn1* silencing by dsRNA on toxicity of activated Cry1Ac (A) and Cry1Ac protoxin (B) in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

* 差异显著(95%) Significant difference at 95% level. 图 3 和 4 同 The same for Figs. 3 and 4.

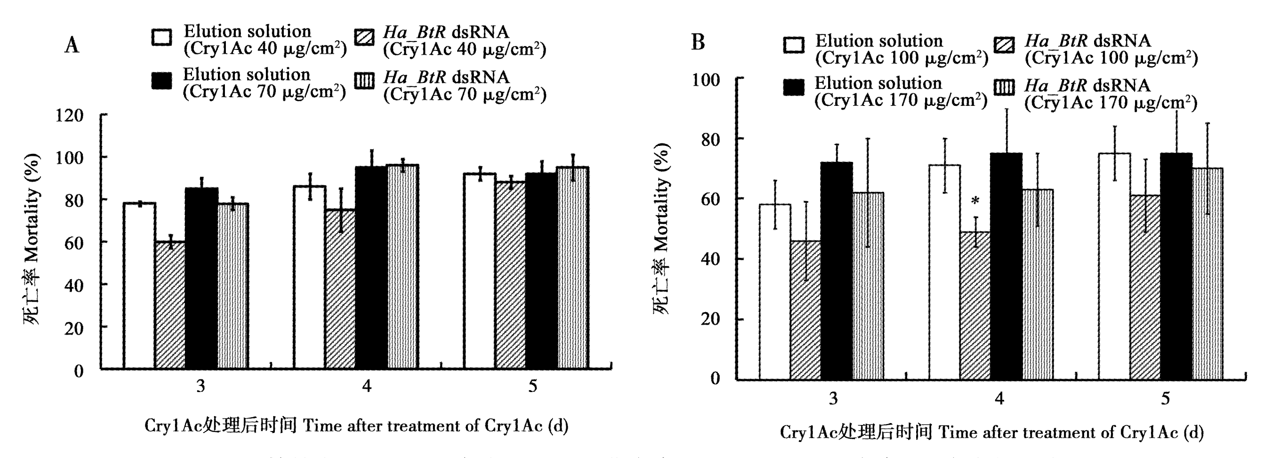


图 3　棉铃虫 *Ha_BtR* 沉默对 Cry1Ac 活化毒素(A)和 Cry1Ac 原毒素(B)毒力的影响

Fig. 3　Effects of *Ha_BtR* silencing by dsRNA on toxicity of activated Cry1Ac (A) and Cry1Ac protoxin (B) in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

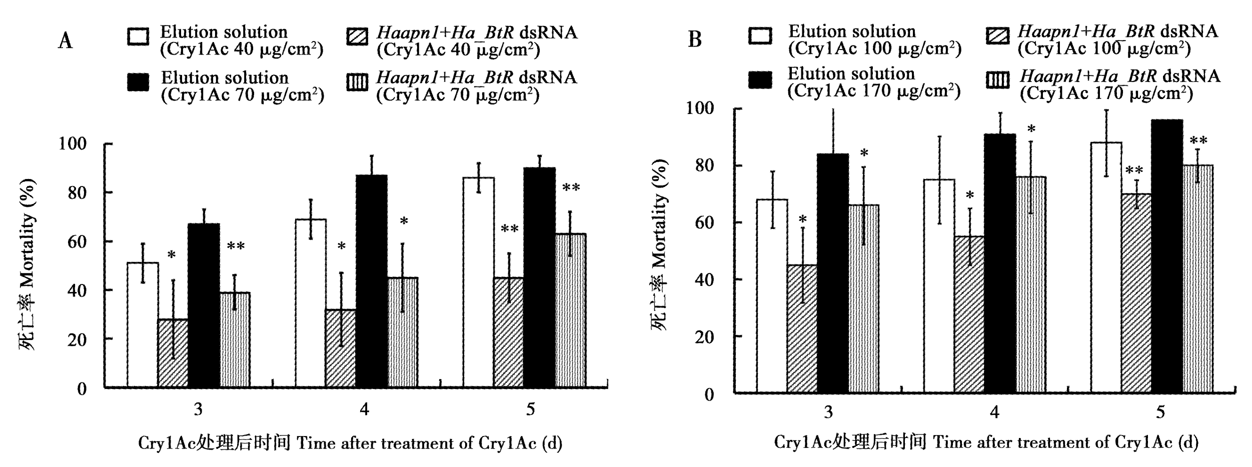


图 4　棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因同时沉默对 Cry1Ac 活化毒素(A)和 Cry1Ac 原毒素(B)毒力的影响

Fig. 4　Effects of both *Haapn1* and *Ha_BtR* silencing by dsRNA on toxicity of activated Cry1Ac (A) and Cry1Ac protoxin (B) in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

** 差异极显著(99%) Significant difference at 99% level.

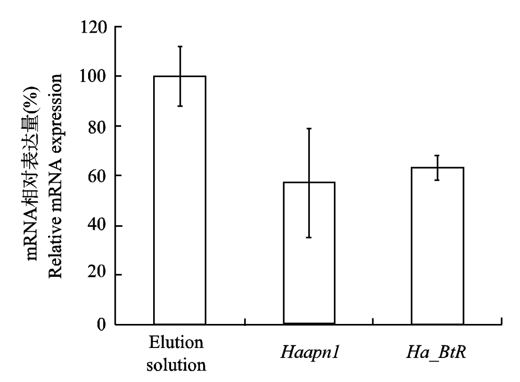


图 5 同时注射 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 基因 dsRNA 后棉铃虫 4 龄幼虫的 mRNA 表达量

Fig. 5 *Haapn1* and *Ha_BtR* mRNA expression levels in 4th instar larvae of *Helicoverpa armigera* injected with a mixture of *Haapn1* and *Ha_BtR* dsRNAs

3 讨论

氨肽酶 N 是 Bt 杀虫蛋白的重要结合受体，其表达量与抗性有关。Gill 和 Ellar（2002）将烟草天蛾的 APN 转入果蝇中进行活体表达，当 APN 受体在中肠组织表达时，原来对 Cry1Ac 不敏感的果蝇在 Cry1Ac 50 ng/μL 的作用下死亡；在对 Cry1Ca 有抗性的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中，用 Northern blot 未能检测到 APN1 的表达（Herrero *et al.*, 2005）；注射 APN dsRNA 干扰斜纹夜蛾 APN 的表达，结果降低了斜纹夜蛾对毒素 Cry1C 的敏感性（Rajagopal *et al.*, 2002）。在本实验中，注射 *Haapn1* dsRNA 后，棉铃虫 4 龄幼虫的 *Haapn1* 表达量下降，Cry1Ac 活化毒素的作用效果与对照组幼虫比较明显下降，表明 *Haapn1* 的表达量降低后影响棉铃虫对 Cry1Ac 活化毒素的敏感性，说明 *Haapn1* 是 Bt 的作用受体；但 *Haapn1* 被干扰后，对 Cry1Ac 原毒素毒力的影响并不明显。Cry1Ac 原毒素在棉铃虫中肠活化与体外用胰蛋白酶活化存在一定差异(吴益东，未发表资料)，该差异有可能导致基因沉默对原毒素和活化毒素敏感性的不同效应。

在 3 种鳞翅目昆虫中都发现钙粘蛋白受体的突变与 Cry1Ac 抗性有关，迄今已发现 12 种钙粘蛋白突变等位基因可导致对 Cry1Ac 抗性的产生（Gahan *et al.*, 2001；Morin *et al.*, 2003；Xu *et al.*, 2005；Soberón *et al.*, 2007；Yang *et al.*, 2007；Zhao *et al.*, 2010）。Xu 等(2005)用 Cry1Ac 活化毒素筛选得到有 564 倍抗性的品系（GYBT），其 *Ha_BtR* 在第 1 285位变异产生一个提前终止的密码子 TAA，仅编码 428 个氨基酸残基。Yang 等(2009)用 GYBT 和 SCD 敏感品系杂交、回交数代后得到一个 *Ha_BtR* 缺失突变近等基因系 SCD-r1，其抗性基因是完全隐性的。SCD-r1 品系对 Cry1Ac 有 438 倍的抗性，其与 SCD 杂交后代(F_1)对 Cry1Ac 完全敏感，即在 *Ha_BtR* 基因表达量降低 50% 的情况下，Cry1Ac 毒素仍能正常发挥毒杀作用。在本实验中，当 *Ha_BtR* 基因表达下降 30% 左右后，对 Cry1Ac 原毒素及活化毒素的作用效果无显著影响。据此推测，*Ha_BtR* 基因在完全不表达或表达量很低时，才可能对 Cry1Ac 的毒力产生明显效果。

在烟草天蛾中，氨肽酶 N 和钙粘蛋白是 Cry1A 毒素不可缺少的受体（Bravo *et al.*, 2004），活化毒素单体与钙粘蛋白结合，切除 α-1 螺旋后形成寡聚体，寡聚体与氨肽酶 N 或碱性磷酸酯酶结合（Gómez *et al.*, 2002；Jurat-Fuentes and Adang, 2006），然后在细胞膜脂筏处形成穿孔（Pardo-López *et al.*, 2006）。在本实验中，当 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 同时干扰后，活化毒素和原毒素处理的死亡率显著低于对照，其差异大于 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 分别干扰后死亡率的差异，说明 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 两个受体都与毒素的作用有关，而且在这两个受体的相互协同作用下，毒素能更好地发挥其毒力。本研究的实验结果支持 Bravo 等（2007）描述的毒素穿孔模型。

在棉铃虫中，已用 RNAi 证明了 *Haapn1* 是 Cry1Ac 的受体（Sivakumar *et al.*, 2007）。而在本实验中同时干扰了 *Haapn1* 和 *Ha_BtR*，进一步证明了棉铃虫 *Haapn1* 和 *Ha_BtR* 均是 Bt 毒素 Cry1Ac 的功能受体，这两种受体蛋白共同参与 Cry1Ac 的毒杀作用过程。该结果也表明，*Haapn1* 或 *Ha_BtR* 基因产生突变均可能导致棉铃虫对 Cry1Ac 产生抗性。

现已在棉铃虫中发现 7 种氨肽酶 N（Angelucci *et al.*, 2008），除 *Haapn1* 外的其他几种氨肽酶 N 与 Cry1Ac 的关系尚未清楚。棉铃虫多个氨肽酶 N 和钙粘蛋白在毒素作用过程中的相互作用以及与抗性产生的关系，尚有待进一步研究。

参 考 文 献（References）

Akhurst RJ, James W, Bird LJ, Beard C, 2003. Resistance to the CryAc δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 96: 1290–1299.

Angelucci C, Barrett-Wilt GA, Hunt DF, Akhurst RJ, East PD, Gordon KHJ, Campbell PM, 2008. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the δ-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect*

Biochem. Mol. Biol., 38: 685 – 696.

Bravo A, Gill SS, Soberón M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423 – 435.

Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M, 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1667: 38 – 46.

Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806 – 811.

Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857 – 860.

Gill M, Ellar D, 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.*, 11: 619 – 625.

Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberòn M, 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.*, 513: 242 – 246.

Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA, 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, 6: 96 – 106.

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 92: 166 – 171.

Knight PJ, Crickmore N, Ellar DJ, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, 11: 429 – 436.

Kumar M, Gupta GP, Rajam V, 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *J. Insect Physiol.*, 55: 273 – 278.

LeOra Software, 1987. Polo-PC: A User's Guide to Probit or Logit Analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 5004 – 5009.

Pardo-López L, Gómez I, Rausell C, Sánchez J, Soerón M, Bravo A, 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry*, 45: 10329 – 10336.

Rajagopal R, Arora N, Sivakumar S, Rao NG, Nimbalkar SA, Bhatnagar RK, 2009. Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochem. J.*, 419: 309 – 316.

Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277: 46849 – 46851.

Sivakumar S, Rajiagopal R, Venkatesh GR, Srivastava A, Bhatnagar RK, 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. *J. Biol. Chem.*, 282: 7312 – 7319.

Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabasinik BE, Bravo A, 2007. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318: 1640 – 1642.

Tang QY, Feng MG, 2007. DPS Data Processing System – Experimental Design, Statistical Analysis and Data Mining. Science Press, Beijing. 69 – 71. [唐启义, 冯明光, 2007. DPS 数据处理系统——实验设计、统计分析及数据挖掘. 北京: 科学出版社. 69 – 71]

Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA Jr, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270: 5490 – 5494.

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ, 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321: 1676 – 1678.

Xu XJ, Yu LY, Wu YD, 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 948 – 954.

Yang YH, Yang YJ, Gao WY, Guo JJ, Wu YH, Wu YD, 2009. Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Bull. Entomol. Res.*, 99: 175 – 181.

Yang YJ, Chen HY, Wu SW, Yang YH, Xu XJ, Wu YD, 2006. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 735 – 740.

Yang YJ, Chen HY, Wu YD, Yang YH, Wu SW, 2007. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 6939 – 6944.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP, 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25 – 33.

Zhang SP, Cheng HM, Gao YL, Wang GR, Liang GM, Wu KM, 2009. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 421 – 429.

Zhao J, Jin L, Yang YH, Wu YD, 2010. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40: 113 – 118.

（责任编辑：赵利辉）